

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Hal tersebut dikarenakan pada penelitian ini terdapat manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003). Adapun objek penelitian ini yaitu mencit (*Mus musculus*) jantan. Pengamatan dilakukan pada kadar lipid darah dengan parameter berupa kadar kolesterol, trigliserida, *High Density Lipoprotein* (HDL) dan *Low Density Lipoprotein* (LDL) pada mencit jantan yang diinduksi hiperlipidemia sebelum dan sesudah diberikan jus tanaman honje.

3.2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang mana terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Penelitian ini terdiri dari 7 kelompok. Empat kelompok ialah kelompok yang diberi perlakuan pemberian jus bunga honje (*Etlingera elatior*) dengan dosis masing-masing: 150; 300; 450; 600 mg/kg dari bobot badan mencit. Kelompok kontrol, terdiri dari 2 kelompok mencit yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif merupakan kelompok mencit yang dikondisikan mengalami hiperlipidemia tetapi tidak diberi jus tanaman honje melainkan diberi akuades. Kontrol negatif merupakan kelompok mencit yang tidak mengalami hiperlipidemia dan tidak diberi jus tanaman honje. Kelompok yang terakhir yaitu kelompok yang hanya diberikan jus bunga honje saja dengan dosis 600 mg/kgBB tanpa mengalami hiperlipidemia. Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor/perlakuan. Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) diperoleh dari perhitungan Federer (1977), yaitu :

$$(T - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$(7 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$7(n - 1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$n \geq 22/7$$

$$n \geq 3,14, \text{ maka } n = 3 \sim 4$$

Keterangan

n = jumlah replikasi

T = jumlah perlakuan

Pengacakan kandang dan nomor mencit dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2006). Setelah dilakukan pengacakan maka diperoleh pemetaan kandang yang dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1

Pemetaan Kandang Mencit

Kandang		Nomor Mencit		
A	24	16	22	28
B	1	19	13	20
C	8	25	17	7
D	23	14	5	27
E	26	3	10	21
F	18	4	2	12
G	15	11	9	6

Keterangan:

A: Kontrol negatif

B: Kontrol positif

C: Jus bunga honje

D: Diberi jus bunga honje dengan dosis 150 mg/kg BB/hari

E: Diberi jus bunga honje dengan dosis 300 mg/kg BB/hari

F: Diberi jus bunga honje dengan dosis 450 mg/kg BB/hari

G: Diberi jus bunga honje dengan dosis 600 mg/kg BB/hari

Parameter dilakukan terhadap kadar lipid darah yaitu kadar kolesterol, trigliserida, HDL dan LDL. Sebelum dilanjutkan ketahap perlakuan seluruh hewan percobaan diaklimatisasi terlebih dahulu selama tujuh hari. Setiap hari mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

3.3. Populasi dan Sampel

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) galur Swiss Webster. Sampel penelitian adalah mencit jantan yang sudah diinduksi hiperlipidemia. Parameter dilakukan terhadap kadar lipid darah yaitu kadar kolesterol, trigliserida, HDL dan LDL sebelum diinduksi pakan tinggi lemak, setelah diinduksi pakan tinggi lemak, dan setelah diberikan jus bunga honje.

3.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan mencit (*Mus musculus*) jantan dilakukan di rumah mencit Kebun Botani UPI. Pembuatan jus bunga honje (*Etlingera elatior*) dan pengecekan lipid darah mencit dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Penelitian dilaksanakan selama \pm tiga bulan dari bulan Januari hingga Maret 2019.

3.5. Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap yaitu tahap pra-penelitian, tahap penelitian dan tahap pasca penelitian. Ketiga tahap tersebut dijabarkan sebagai berikut:

1. Tahap pra-penelitian

a. Persiapan alat dan bahan

Kandang sebanyak 7 buah berukuran 28 x 30 x 12 cm disiapkan dalam keadaan bersih dan masing-masing sudah dilengkapi dengan tutup kandang dan tempat minum serta sekam. Pembuatan jus bunga honje memerlukan peralatan seperti pisau dan blender. Kemudian disiapkan juga bahan untuk pembuatan pakan standar dan tinggi lemak. Pembuatan pakan tinggi lemak memerlukan peralatan seperti *oven*, timbangan dan wadahnya. Selain itu, disiapkan juga alat untuk pengambilan darah dan perhitungan kadar lipid darah mencit seperti gunting, kapas, tabung effendorp, tips kuning, tips putih, mikropipet, *centrifuge*, spektrofotometer dan kit untuk pengujian darah yang disimpan dalam lemari pendingin.

b. Pembuatan jus bunga honje

Metode jus bunga honje ini merupakan modifikasi dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Sukmawati & Asgap (2017). Bunga honje didapatkan dari pasar tradisional di daerah Bandung Selatan. Bunga honje segar dicuci terlebih dahulu di bawah air mengalir lalu diiris kecil. Bunga honje yang sudah diiris kemudian ditimbang sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan. Setelah ditimbang, bunga honje dimasukan ke dalam wadah dan ditambahkan aquades sebanyak yang dibutuhkan, kemudian bunga honje dihaluskan menggunakan blender. Bunga honje diblender dalam keadaan segar tanpa dikeringkan terlebih dahulu.

c. Penentuan dosis jus bunga honje

Dosis jus bunga honje yang diberikan sebanyak 150, 300, 450, 600 mg/kgBB. Dosis tersebut merupakan hasil modifikasi dari penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Chairunnisa (2015) dengan dilakukan modifikasi. Setelah dilakukan perhitungan (Lampiran 2), dosis yang digunakan adalah 4,5 mg/30gBB, 9 mg/30gBB, 13,5 mg/30gBB dan 18 mg/30gBB. Terdapat dua kontrol yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Pada kelompok kontrol positif mencit diinduksi pakan tinggi lemak tetapi tidak diberi jus bunga honje. Pada kelompok kontrol negatif mencit tidak diinduksi pakan tinggi lemak dan tidak diberi jus bunga honje. Waktu pemberian dosis dilakukan selama 30 hari setelah sebelumnya diberi pakan tinggi lemak selama 20 hari

d. Persiapan hewan percobaan

Mencit jantan yang digunakan yaitu yang berumur $\pm 2-3$ bulan dengan berat badan $\pm 25-30$ gram. Hewan percobaan dikelompokkan secara acak menjadi 7 kelompok dengan 2 kelompok kontrol. Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor. Setiap 1 kelompok mencit ditempatkan pada kandang berukuran 28 x 30 x 12 cm yang dilengkapi dengan tutup kandang dan tempat minum. Selama 7 hari mencit dilakukan proses aklimatisasi agar mencit beradaptasi dengan lingkungan sekitar selama masa percobaan. Mencit diaklimatisasi dengan lingkungan sekitar yang bersifat konstan yaitu dengan suhu ruangan berkisar 23-27°C dan pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Selama proses aklimatisasi mencit diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Sebelum dan sesudah aklimatisasi mencit ditimbang berat badan dan diambil sampel darahnya.

e. Pembuatan pakan tinggi lemak

Pakan tinggi lemak dibuat berdasarkan penelitian Hernawati dkk. (2013) (Tabel 3.2). Komposisi pakan berlemak tinggi yang digunakan terdiri atas tepung jagung, tepung ikan, bungkil kedelai, telur, minyak kelapa, *premix*, garam dan CaCO_3 . Sumber lemak didapatkan dari

penambahan jumlah kuning telur dan minyak kelapa. Total lemak kasar yaitu 10,151% (Hernawati, dkk. 2013)

Tabel 3.2

Komposisi Pakan Tinggi Lemak (Hernawati, dkk. 2013)

No.	Bahan	Jumlah penambahan (%)	Lemak kasar (%)
1	Tepung jagung	60	2,154
2	Tepung ikan	8	0,601
3	Bungkil kedelai	20	0,532
4	Telur	3	0,960
5	Minyak kelapa	6	0
6	<i>Premix</i>	1	0
7	Garam	1	0
8	CaCO ₃	1	5,904

2. Tahap penelitian

a. Pemberian pakan tinggi lemak

Mencit diinduksi dengan pemberian pakan tinggi lemak sebanyak 30g/ekor/hari setiap pagi dan sore hari, kecuali pada kelompok kontrol negatif yang diberi pakan standar. Pemberian pakan tinggi lemak dilakukan selama 20 hari.

b. Pemberian jus bunga honje

Pemberian jus bunga honje dilakukan selama 30 hari dengan dosis 150, 300, 450 dan 600 mg/kgBB. Jus bunga honje diberikan secara oral menggunakan sonde oral. Selama perlakuan mencit dibagi menjadi tujuh kelompok yaitu:

- 1) Kelompok A: kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan, yaitu mencit yang diberi pakan standar dan tidak diberi jus bunga honje.
- 2) Kelompok B: kontrol positif, yaitu mencit yang diberi pakan tinggi lemak tetapi tidak diberi jus bunga honje.
- 3) Kelompok C: honje saja, yaitu mencit yang diberi pakan standar dan diberi jus bunga honje.
- 4) Kelompok D: perlakuan dengan dosis 1 yang diberi jus bunga honje sebanyak 4,5 mg/30gBB/hari.
- 5) Kelompok E: perlakuan dengan dosis 2 yang diberi jus bunga honje sebanyak 9 mg/30gBB/hari.

- 6) Kelompok F: perlakuan dengan dosis 3 yang diberi jus bunga honje sebanyak 13,5 mg/30gBB/hari.
- 7) Kelompok G: perlakuan dengan dosis 4 yang diberi jus bunga honje sebanyak 18 mg/30gBB/hari.

c. Pengambilan sampel darah dan pengukuran kadar lipid darah

Pengambilan sampel darah dilakukan sebanyak tiga kali, yaitu pada awal setelah aklimatisasi, setelah 20 hari diberi pakan tinggi lemak dan setelah 30 hari perlakuan dengan pemberian jus bunga honje. Posisi pengambilan sampel darah yaitu pada bagian vena lateral ekor. Pengambilan darah dilakukan dengan cara melukai bagian ujung ekor kemudian diurut secara perlahan hingga darah menetes ke dalam tabung eppendorf.

Sampel darah yang diambil sekitar 0,5-1,0 ml yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Tabung eppendorf yang berisikan sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 2500-300 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi diambil bagian supernatan (serum) menggunakan pipet berkala. Metode yang dilakukan untuk menguji menggunakan *Cholesterol Oxidase Para-aminophenazone* (CHOD-PAP) dan *Glycerol Phosphate Oxidase Para-aminophenazone* (GPO-PAP) secara spektrofotometri (Trinder, 1969). Dasar metode CHOD-PAP dan GPO-PAP adalah oksidasi dan hidrolisis enzimatis. Pengukuran LDL dengan metode Friedewald (Friedewald, dkk. 1972). Untuk pengukuran kadar kolesterol total, trigliserida dan HDL menggunakan spektrofotometri dengan mencampurkan serum dan reagen BIOLABO. Berikut tahapan untuk pengukuran kadar lipid darah hewan uji (Trinder, 1969):

1) Uji kolesterol total

Larutan blanko disiapkan dengan cara mencampurkan 5 μ L ddH₂O dan 0,5 mL reagen. Larutan standard disiapkan dengan cara mencampurkan 5 μ L standard dan 0,5 mL reagen kolesterol. Campuran serum yang akan dihitung atau *assay* dibuat dengan mencampurkan serum sebanyak 5 μ L dan 0,5 mL reagen. Ketiga jenis campuran tersebut dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruangan lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm. Setelah itu diperoleh

data dari spektrofotometer kemudian data dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer}}{\text{Absorbansi standard}} \times 200 = \text{Kolesterol total}$$

2) Uji trigliserida

Larutan blanko disiapkan dengan cara mencampurkan 5 µL ddH₂O dan 0,5 mL reagen. Sementara larutan standard disiapkan dengan cara mencampurkan 5 µL standard dan 0,5 mL reagen trigliserida. Campuran serum yang akan dihitung atau *assay* dibuat dengan mencampurkan serum sebanyak 5 µL dan 0,5 mL reagen. Ketiga jenis campuran tersebut dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruangan lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm. Setelah itu diperoleh data dari spektrofotometer kemudian data dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer}}{\text{Absorbansi standard}} \times 200 = \text{Trigliserida}$$

3) Uji HDL

Uji HDL dilakukan dengan cara diambil 0,1 ml serum dan dicampur *precipitant* sebanyak 10 µl. Campuran lalu didiamkan selama 10 menit di suhu ruangan dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm dan diambil bagian supernatan. Supernatan digunakan sebagai pengganti serum. Larutan blanko disiapkan dengan cara mencampurkan 0,5 mL reagen HDL dengan 12,5 µl ddH₂O. Larutan standard disiapkan dengan cara mencampurkan 0,5 mL reagen dengan 12,5 µL supernatan. Campuran serum yang akan dihitung atau *assay* dibuat dengan cara mencampurkan reagen sebanyak 0,5 mL dengan 12,5 µL supernatan. Kemudian dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm dan dihitung nilainya menggunakan rumus :

$$\frac{\text{Absorbansi hasil spektrofotometer}}{\text{Absorbansi standard}} \times 100 = \text{HDL}$$

4) Uji LDL

Setelah semua pengujian dilakukan, nilai LDL baru dapat dihitung dengan rumus : $\text{Kolesterol total} - (\text{HDL} + 1/5 \text{ Triglicerida}) = \text{LDL}$.

3.6. Analisis data

Analisis data menggunakan program SPSS 22 *for Windows*. Tahap pengujiannya yaitu pertama dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* kemudian uji homogenitas dengan *test of Homogeneity of Variances (Levene Statistics)*. Data yang terdistribusi normal dan homogen dianalisis dengan uji parametrik menggunakan uji analisis varian (ANOVA) *one way*. Data yang memiliki perbedaan signifikan dilakukan uji lanjutan dengan uji *Duncan* menggunakan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Uji T berpasangan atau *Paired Samples T Test* dilakukan untuk mengetahui perbedaan sebelum dan sesudah perlakuan.

Apabila data yang diperoleh tidak homogen maka dilakukan uji non parametrik dengan uji *Kruskall-Wallis*. Data yang perbedaannya tidak signifikan tidak diuji lebih lanjut sementara data yang perbedaannya signifikan diuji dengan *Mann-Whitney*. Selanjutnya, uji *Wilcoxon* untuk mengetahui perbedaan sebelum dan sesudah perlakuan.